



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyysw@sina.com

乳酸脱氢酶(LDH)活性检测试剂盒(可见分光光度法)

货号: R41844

规格: 50T/24S

保质期: 6个月

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
提取液ES08	30ml×1瓶	2-8℃保存;
试剂-A	25ml×1瓶	2-8℃保存;
试剂-B	粉剂×1支	-20℃保存, 用时加入1.3ml蒸馏水充分溶解备用, 建议现配现用, 也可以小剂量分装保存, 两周内有效, 避免反复冻融;
试剂-C	25ml×1瓶	2-8℃避光保存;
试剂-D	60ml×1瓶	2-8℃保存;
标准品 (2 μmol/ml)	1ml×1支	2-8℃保存。

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

简介

意义: 乳酸脱氢酶 (Lacate Dehydrogenase, LDH, EC 1.1.1.27) 广泛存在于动物、植物、微生物和培养细胞中, 是糖酵解途径的末端酶, 催化丙酮酸与乳酸之间的可逆反应, 伴随着 NAD⁺/NADH 之间互变。

原理: LDH 催化 NAD⁺ 氧化乳酸生成丙酮酸, 丙酮酸进一步与 2,4 - 二硝基苯肼作用生成丙酮酸二硝基苯腙, 在碱性溶液中显棕红色, 颜色深浅与丙酮酸浓度成正比。

自备用品:



可见分光光度计、1ml 玻璃比色皿、水浴锅、天平、烘箱、玻璃管、离心机、可调式移液枪、研钵、冰和蒸馏水。

粗酶液提取:

1. 组织样品的制备: 按照组织质量(g): 提取液 ES08 体积(ml)为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g组织, 加入 1ml 提取液 ES08), 进行冰浴匀浆。8000g 4℃ 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

2. 细菌、细胞样品的制备: 先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 按照细菌或细胞数量 (10^4 个): 提取液 ES08 体积(ml)为 500~1000: 1 的比例 (建议 500 万细菌或细胞加入 1ml 提取液ES08), 超声波破碎细菌或细胞 (冰浴, 功率 20%或 200W, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次); 8000g 4℃ 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

3. 血清 (浆) 样品: 直接检测。

测定步骤:

1. 分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 450nm, 蒸馏水调零。
2. 制备标准品: 取适量标准品原液, 然后用蒸馏水进行倍比稀释至 1、0.5、0.25、0.125、0 μ mol/ml, 用 2、1、0.5、0.25、0.125、0 μ mol/ml 做标准曲线。
3. 在 EP 管中加入下列试剂:

试剂名称	对照管(ul)	测定管(ul)	标准管(ul)
样本	50	50	
标准品			50
试剂-A	250	250	250
试剂-B		50	
蒸馏水	50		50
充分混匀, 37℃(哺乳动物)或25℃(其它物种)准确水浴15min			
试剂-C	250	250	250
充分混匀, 37℃(哺乳动物)或25℃(其它物种)准确水浴15min			
试剂-D	750	750	750
充分混匀, 室温静置3min,450nm下测定吸光度, 计算 $\Delta A=A_{\text{测定管}}-A_{\text{对照管}}$ 。			
注: 每个测定管需要设一个对照管。			



乳酸脱氢酶活力计算:

1. 标准曲线绘制: 以标准液浓度为x轴, A标准为y轴, 绘制标准曲线, 得到标准方程, 将 ΔA 测定代入公式得到x ($\mu\text{mol/ml}$)。

2. 血清(浆) LDH 活力的计算:

单位的定义: 每 ml 血清(浆) 每分钟催化产生 1nmol 丙酮酸定义为一个酶活力单位。

$$\text{LDH (U/mL)} = x \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样}} \div T \times 10^3 = 66.7x$$

3. 细胞、细菌和组织中 LDH 活力的计算:

(1) 按样本蛋白浓度计算:

单位的定义: 每 mg 组织蛋白每分钟催化产生 1 nmol 丙酮酸定义为一个酶活力单位。

$$\text{LDH (U/mg prot)} = x \times V_{\text{样}} \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T \times 10^3 = 66.7 \times x \div C_{\text{pr}}$$

(2) 按样本鲜重计算:

单位的定义: 每 g 组织每分钟催化产生 1nmol 丙酮酸定义为一个酶活力单位。

$$\text{LDH (U/g 鲜重)} = x \times V_{\text{样}} \div (W \div V_{\text{样总}} \times V_{\text{样}}) \div T \times 10^3 = 66.67 \times x \div W$$

(3) 按细菌或细胞密度计算:

单位的定义: 每 1 万个细菌或细胞每分钟催化产生 1nmol 丙酮酸定义为一个酶活力单位。

$$\text{LDH (U/10}^4 \text{ cell)} = x \times V_{\text{样}} \div (500 \div V_{\text{样总}} \times V_{\text{样}}) \div T \times 10^3 = 0.133x$$

注: V 样: 加入反应体系中样本体积, 0.05mL; V 样总: 加入提取液的体积, 1 ml; T: 反应时间, 15 min; C_{pr}: 蛋白质浓度, mg/ml; W: 样本质量, g; 500: 细胞或细菌总数, 500 万; 10^3 : $1\mu\text{mol/mL} = 10^3 \text{ nmol/mL}$ 。